

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, LIMPEZA E PURIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA¹

Cristiane Regina Bueno Aguirre Ramos², Edward Madureira Brasil³,
Robson Maia Geraldine³

ABSTRACT

EVALUATION OF EXTRACTION, CLEANING AND PURIFICATION METHODS OF AFLATOXINS FOR HPLC ANALYSIS

A comparative evaluation process was carried out between two methods of aflatoxins extraction, cleaning, and purification, for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis. The first one is the physical-chemical method, based on chemical reactions for all the stages, and the second makes use of a immunoaffinity column (IAC). The methods were evaluated as related to recovery percentage, cost, time spent for analysis, and number of samples analyzed per day. The recovery percentage obtained through the physical-chemical method was lower than the IAC method to B₁, B₂ and G₁ aflatoxins, and higher to G₂ aflatoxin. Both techniques presented recovery percentages in accordance with established values by the European Community (70% to 120%). Concerning costs, the physical-chemical method showed to be the least expensive, but its analysis process takes more time, because it involves more steps and demands more caution from laboratory technicians. Despite its higher cost, about six times higher than the physical-chemical method, the IAC method showed to be faster and easier to perform.

KEY-WORDS: Recovery; aflatoxins; extraction methods; immunoaffinity; HPLC.

INTRODUÇÃO

O milho está entre os principais produtos agrícolas comercializados no Brasil, onde se destaca entre os grãos, respondendo pelo segundo maior valor da produção, superado apenas pela soja. É, ainda, o principal ingrediente utilizado na produção de rações para alimentação animal (Nogueira Netto 1996).

O Estado de Goiás tem se tornado um grande pólo produtivo nos últimos anos, sendo responsável por 7,07% da produção nacional de milho (Agriannual 2007). Entre 1973 e 2000, o Estado que apresentou

RESUMO

Foi realizada avaliação comparativa de dois métodos de extração, limpeza e purificação de aflatoxinas, para análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência. Um dos métodos é físico-químico e baseia-se em reações químicas para todas as etapas. O outro utiliza coluna de imunoafinidade. Os métodos foram avaliados quanto à porcentagem de recuperação, custo do processo, tempo gasto para análise e número de amostras analisadas por dia. A recuperação obtida pelo método físico-químico foi mais baixa do que a do método de imunoafinidade, para as aflatoxinas B₁, B₂ e G₁, porém mais alta para G₂. Ambos os métodos apresentaram valores de recuperação dentro da faixa estabelecida pela Comunidade Européia, que vai de 70% a 120%. A análise comparativa de custos revelou que estes foram menores no método físico-químico. Porém, suas análises são demoradas, por envolverem várias etapas, e exigem maior cautela por parte do laboratorista. Apesar do custo mais elevado, aproximadamente seis vezes superior ao do método físico-químico, o método de imunoafinidade apresenta maior rapidez e facilidade de execução.

PALAVRAS-CHAVE: Recuperação; aflatoxinas; métodos de extração; imunoafinidade; CLAE.

maior crescimento em produção foi Goiás, tendo mais que triplicado, ao final de duas décadas (Souza & Braga 2004).

O milho constitui um dos principais insumos para o segmento produtivo, sendo utilizado com destaque no arraçamento de animais, em especial na suinocultura, avicultura e bovinocultura de leite, tanto na forma *in natura*, como na forma de farelo, de ração ou silagem. Na alimentação humana, o milho é, comumente, consumido *in natura*, na forma de milho verde, e também em produtos como o pão, a farinha e massas. Estima-se que existam mais de

1. Trabalho recebido em jan./2006 e aceito para publicação em abr./2008 (nº registro: PAT 682)

2. Rua GV 05, Quadra 13, Lote 24, Granville, Goiânia. E-mail: cris.bueno@brturbo.com.br.

3. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. Av. Goiânia-Nova Veneza, km 0, Campus Samambaia, CEP 74001-970 Goiânia, GO. E-mails: ebrasil@agro.ufg.br, robson.agro.ufg@gmail.com.

3.500 usos diferentes para os produtos que se extraem do milho (amido, xarope, álcool, óleo vegetal e glúten), os quais se prestam a inúmeras e diversificadas aplicações (Fornasieri Filho 2007).

A cultura do milho é atacada por inúmeros fungos, inclusive por aqueles micotoxigênicos, os quais podem produzir micotoxinas, que são metabólitos tóxicos, quando consumidos por animais e pelo homem (Lazzari 1993, 1997). Essas micotoxinas contaminam grande parte dos produtos agrícolas e alimentos produzidos no mundo, provocando sérios danos às lavouras, à produção de alimentos e à saúde humana e animal (Vargas & Souza 1999). Dentre essas micotoxinas, destacam-se as aflatoxinas, devido ao potencial carcinogênico, com ênfase para a aflatoxina B₁. Além de ser encontrada em grande número de alimentos e rações, esta ainda é termostável e muito difícil de ser inativada. Atualmente, não existem métodos economicamente viáveis para detoxificação de aflatoxinas, que não afetem as qualidades organolépticas do alimento (Lazzari 1995).

Centenas de trabalhos foram realizados após a descoberta das aflotoxinas, na década de 1960; seja para identificar os níveis de contaminação destas micotoxinas nos alimentos e rações, seja para desenvolver métodos de análises cada vez mais precisos, rápidos e econômicos. De 1961 a 1990, os pesquisadores brasileiros publicaram 85 trabalhos na área de micotoxinas, sendo a sua maioria a respeito de suas ocorrências em alimentos (Sabino & Rodrigues-Amaya 1993). Entre 1993 a 2000, essas publicações aumentaram muito, sendo que, nesses oito anos, tais pesquisadores publicaram 128 trabalhos nesta área (Rodríguez-Amaya & Sabino 2002).

O presente trabalho objetivou avaliar, comparativamente, os parâmetros técnicos e econômicos de dois métodos de extração, limpeza e purificação de aflatoxinas, para análise de amostras de milho em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, em inglês HPLC).

MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises, foram coletadas seis amostras de 2,0 kg milho, provenientes de híbridos cultivados em Goiânia. De cada amostra, 500 g de grãos foram triturados em moinho elétrico com peneira de 425 µm, e armazenados à temperatura de -4°C até o processamento das análises.

Pesaram-se duas alíquotas de 50 g de cada amostra e, em seguida, uma delas foi contaminada com concentrações conhecidas dos padrões de aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂, os quais foram obtidos através da Sigma Chemical Co. (EUA). A preparação foi feita segundo o método descrito na Instrução Normativa nº 9 (24 de março de 2000), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil 2000).

Foram avaliados dois métodos de extração, limpeza e purificação, sendo eles o método físico-químico, baseado em reações químicas, para todas as etapas, e o método de imunoafinidade, baseado na utilização de colunas de imunoafinidade, nas etapas de limpeza e purificação.

A concentração de aflatoxina foi analisada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian ProStar Dynamax), com duas bombas (modelo 210) e injetor manual. Foi utilizado detector de fluorescência (modelo 363, Varian), em comprimento de onda de 365 nm para excitação, e 428 nm para emissão. Foi realizada derivatização pós-coluna, utilizando-se solução saturada de iodo (1,0 g de iodo em 20 mL de metanol e 200 mL de água Milli-Q, aquecida a 40°C, sob agitação constante, por trinta minutos), filtrada em membrana hidrofílica 0,45 µm (Milipore) e desgasificada em ultrassom (modelo D-409X ADTI – CTA do Brasil Ltda., 40 khz de frequência), por quarenta minutos.

Utilizou-se coluna C18 - fase reversa (Microsorb-MV, Varian), 250 mm x 4,6 mm, sendo mantida em banho-maria, a 75°C. Uma conexão em forma de "T" foi colocada pós-coluna, promovendo o contato do efluente com a solução derivatizante, que, durante a passagem pelo tubo em espiral (*coil*), possibilitou a derivatização das aflatoxinas B₁ e G₁. O *coil* (1.000 mm x 0,3 mm) também foi mantido em banho-maria, a 75°C. A fase móvel utilizada foi: 60% de água pura (Milli-Q), 35% de metanol e 5% de acetonitrila. Para análise, foram injetadas alíquotas de 100 µL do ressuspenso filtrado. O fluxo foi de 0,9 mL/min., para a fase móvel, e 0,3 mL/min., para a solução de iodo. O limite de detecção foi de 1 ng.

Método físico-químico

A extração de aflatoxinas por este método foi realizada conforme metodologia de Jorge (2004)¹. Foram pesados 50 g de amostra triturada e adicionados

200 mL de solução metanol/água (70:30 v/v), mantendo-se a mistura sob agitação, durante trinta minutos. A seguir, procedeu-se à filtração (papel de filtro Whatman nº 4). Posteriormente, tomou-se alíquota de 100 mL do filtrado, sendo adicionados 100 mL de solução de sulfato de cobre II, a 10 % (m/v), e 3 g de celite. Essa solução foi agitada por dois minutos e, então, filtrada novamente (papel de filtro Whatman nº4). Uma alíquota de 100 mL desse filtrado foi colocada em funil de separação, onde foram adicionados 100 mL de água destilada.

Na fase de purificação, adicionaram-se 20 mL de clorofórmio ao funil de separação, o qual foi agitado, manualmente, durante dois minutos, e deixado em repouso para separação das fases. O extrato clorofórmico, fase inferior, foi coletado em frascos de vidro âmbar. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Os extratos clorofórmicos foram colocados no mesmo frasco e evaporados à secura, por ventilação forçada (12 h) em câmara de fluxo laminar. O extrato seco foi armazenado, à temperatura de -4°C, por, no máximo, três dias, antes de ser analisado. Para esta análise, o extrato seco foi ressuspenso em 20 mL de solução, contendo 60% de água pura (Milli-Q), 35% de metanol (grau CLAE) e 5% de acetonitrila (grau CLAE). O ressuspenso foi filtrado em membrana hidrofílica 0,45µm (Milipore).

Método com uso de coluna de imunoafinidade

A coluna de imunoafinidade Easi-Extract Aflatoxin (R-Biopharm Rhône Ltd), foi utilizada para análise de aflatoxinas, seguindo-se o procedimento descrito pelo fabricante. Assim, inicialmente, pesou-se alíquota de 50 g de cada amostra, adicionando-se 100 mL de solução metanol/água (80:20 v/v), sendo mantidos sob agitação manual, durante dois minutos. A alíquota proveniente do processo de extração foi filtrada (papel de filtro Whatman nº 4), tomando-se 2,0 mL do filtrado e adicionando-se 14 mL de tampão fosfato (PBS), pH 7,4, o que correspondeu a 1,0 g da amostra. Após o condicionamento das colunas de imunoafinidade, com tampão fosfato (20 mL), a amostra foi introduzida na coluna. Em seguida, foram passados 20 mL de água destilada e a aflatoxina

eluída, com 1,5 mL de metanol, sendo coletado em frasco de vidro âmbar. O eluato foi filtrado em membrana hidrofílica 0,45µm (Millipore).

O fluxo de eluentes pela coluna de imunoafinidade foi controlado para 5,0 mL/min. Com esta finalidade, foi feita a adaptação de um sistema a vácuo na coluna de extração em fase sólida (tipo Manifold). Este foi constituído de um suporte em acrílico (capacidade para dez colunas), com sistema de fluxo de ar, mantido por bomba pneumática e por reguladores de vazão individualizados para cada coluna (Figura 1).

Os métodos de extração, limpeza e purificação foram avaliados, quanto ao custo do processo, levando-se em consideração o tempo gasto para a análise e o número de amostras realizadas por dia. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos (método físico-químico e de imunoafinidade) e seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste F, à 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sanest (Zonta & Machado 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos cromatogramas da análise de aflatoxinas, observaram-se picos menores para as aflatoxinas G₁ e G₂, em relação às aflatoxinas B₁ e B₂, na mesma concentração (Figura 2). Considerando-se que a altura do pico em um cromatograma está diretamente relacionada ao limite de detecção (menor pico, maior interferência dos ruídos), a aflatoxina G₁, com menor resolução, requer taxas maiores de recuperação, para que o limite de detecção não seja afetado. Os limites



Figura 1. Aparelho controlador de fluxo, desenvolvido para o método com uso de coluna de imunoafinidade.

¹ Roberto Montero Jorge, pesquisador pleno do Laboratório de Contaminantes e Autenticidade – Nestlé do Brasil Ltda. Rua Guido Caloi, n.1935, piso 3, bloco A, Jardim São Luiz - São Paulo - SP (Comunicação pessoal). 2004.

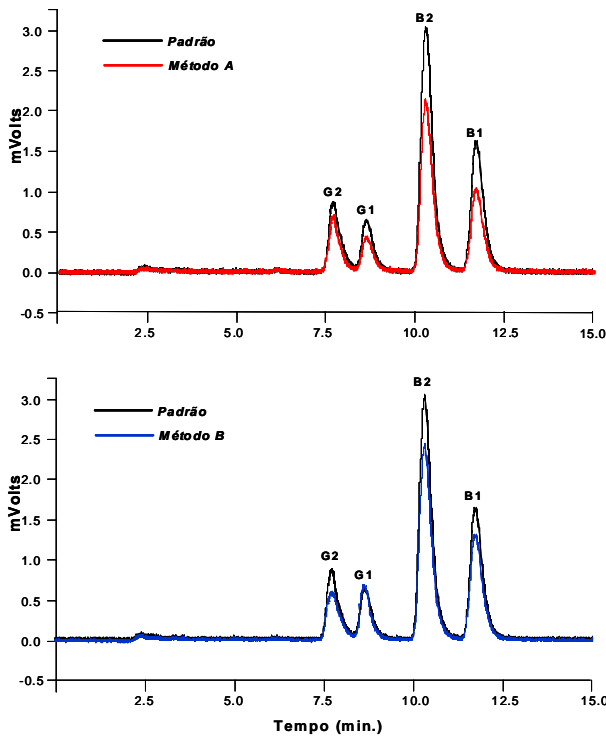


Figura 2. Cromatogramas de amostras de milho, contaminadas com $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 , extraídas pelo método físico-químico (A) e usando coluna de imunoafinidade (B), analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

de detecção para as aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 foram, respectivamente 1,5 ng, 1,6 ng, 1,5 ng e 2 ng.

A recuperação obtida pelo método físico-químico foi menor do que pelo método de coluna de imunoafinidade, para as aflatoxinas B_1 , B_2 e G_1 ; porém, mais alta para G_2 ($p < 0,01$) (Figura 3). Ambos os métodos, todavia, apresentaram valores de recuperação dentro da faixa estabelecida pela diretiva 98/53/CE, da Comunidade Européia (1998), que é de 70% a 120%.

No método de coluna de imunoafinidade, essa recuperação apresentou valores entre 79,2% e 101,4%, que foram superiores à recuperação obtida por Trucksses et al. (1991), utilizando coluna de imunoafinidade (Aflatest Vicam), também em milho. A porcentagem de recuperação varia conforme o método de extração e a matriz sob análise, devido aos interferentes presentes. Akiyama et al. (2001) conseguiram resultados adequados em pimentão, utilizando coluna multifuncional (MultiSep # 228), com recuperação superior a 90% para aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 . Para noz-moscada, os autores conseguiram

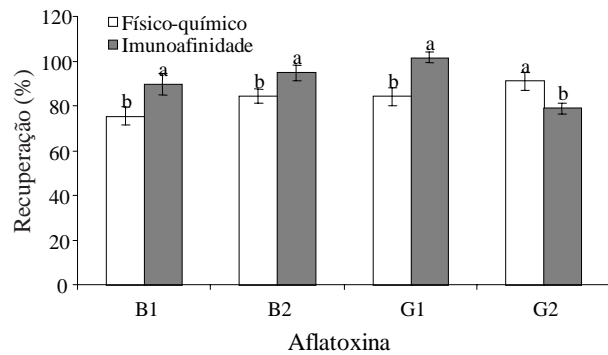


Figura 3. Porcentagem de recuperação de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) pelos métodos físico-químico e usando coluna de imunoafinidade (colunas encabeçadas por uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade).

recuperações acima de 80%. Determinadas matrizes podem ser analisadas com maior facilidade, como é o caso do milho, mas outros alimentos de composição mais complexa, como as rações, tornam o processo de extração mais difícil. Garner et al. (1993), analisando pimenta malagueta, conseguiram recuperação de, aproximadamente, 70%, utilizando colunas de imunoafinidade, para todas as aflatoxinas analisadas, porém com valores inferiores aos obtidos para pimentão e gengibre.

A análise comparativa de custo (Tabela 1) revelou que estes foram menores no método físico-químico (R\$ 4,91). Contudo, neste método, as análises são demoradas (40 minutos) e, por envolver várias etapas, exige maior cautela do laboratorista. Além disso, o método requer a secagem dos extratos clorofórmicos, o que demanda de trinta minutos (secagem sob corrente de N_2) a doze horas (secagem em câmara de fluxo laminar).

Apesar do custo elevado do método com o uso de coluna de imunoafinidade (aproximadamente seis vezes superior ao do método físico-químico), o mesmo apresenta maior rapidez e facilidade de execução. Segundo Prado (2005), as maiores vantagens desse método são a necessidade de pouca preparação da amostra, alta especificidade e seletividade de micotoxinas, e a possibilidade de se testar uma grande variedade de produtos com o mesmo tipo de coluna. A coluna de imunoafinidade permite automação do processo de extração, sendo o número de amostras dependente do número de entradas no aparelho controlador de fluxo. Com o controlador de fluxo desenvolvido para este estudo, foi possível conduzir

Tabela 1. Estimativas de custo para o processo de extração e limpeza de aflatoxinas, utilizando-se o método físico-químico e usando coluna de imunoafinidade.

Métodos	Material	Descrição	Qtd	Valor (R\$)	
Físico-Químico	Metanol 70%	300 mL água 700 mL metanol	200 mL	1,30	
	Papel de Filtro	Whatman nº4	2 un.	0,24	
	Sulfato de cobre II 10%	100 g sulfato Cu II 900 mL água destilada	100 mL	0,23	
	Celite		3 g	0,17	
	Clorofórmio		60 ml	1,09	
	Mão-de-obra	15 amostras/dia/técnico		2,00	
Total				R\$ 4,91	
Imunoafinidade	Metanol (80%)	200 mL água 800 mL metanol	100 mL	1,80	
	Metanol		1,5 mL	0,14	
	Papel de Filtro	Whatman nº4	1 un.	0,12	
	Tampão PBS	8 g NaCl			
		1,2 g Na ₂ HPO ₄ anidro			
		0,2 g KH ₂ PO ₄			
	Coluna de imunoafinidade	0,2 g KCl			
990 mL água				0,01	
Mão-de-obra	80 amostras/dia/técnico	1 un.	30,00	0,38	
Total				R\$ 32,45	

a extração, limpeza e purificação de dez amostras, concomitantemente, em aproximadamente uma hora. Porém, a coluna de imunoafinidade contém quantidade definida de anticorpos, o que implica em um limite para retenção das aflatoxinas na coluna. Acima desse limite, as aflatoxinas não se ligarão mais, pois todos os sítios já estarão saturados (Prado 2005). Apesar da facilidade de análise através de colunas de imunoafinidade, estas, por serem importadas, são de custo relativamente elevado. Assim, há premente necessidade de produção nacional de imunorreagentes, em maior escala e custo acessível, bem como com o devido controle de qualidade e fiscalização rigorosa dos órgãos competentes.

CONCLUSÕES

1. A recuperação das aflatoxinas foi diferente entre os métodos avaliados. Porém, ambos apresentam valores de recuperação dentro da faixa requerida pela norma da Comunidade Européia.
2. O fator custo apresentou-se como a principal vantagem do método físico-químico, sendo um sexto do custo apresentado pelo método de coluna de imunoafinidade. Contudo, este garante maior rapidez e facilidade de execução, além de permitir automação do processo de extração, limpeza e purificação.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL 2007: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2006.
- AKIYAMA, H. et al. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 932, n. 1, p. 153-157, 12 out. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 9, de 24 de março de 2000. Aprova os métodos analíticos de referência para análise de micotoxinas em produtos, subprodutos e derivados de origem vegetal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 30 mar. 2000. Seção 1, p. 35-41.
- COMUNIDADE EUROPÉIA. Directiva 98/53/CE da Comissão de 17 de Julho de 1998, Anexo II. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 1998. p. 93-101. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:201:0093:0101:PT:PDF>>.
- FORNASIERI FILHO, D. *Manual da cultura do milho*. Jaboticabal: Funep, 2007.
- GARNER, R. C. et al. Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by high-performance liquid chromatographic analysis and post-column derivatisation with pyridinium bromide perbromide. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 648, n. 2, p. 485-490, 1993.
- LAZZARI, F. A. A importância das micotoxinas na qualidade de grãos de milho para alimentação. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA, 3., 1995, Assis. *Resumos...* Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 1995. p. 1-8.
- LAZZARI, F. A. *Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações*. Curitiba: Ed. do Autor, 1993.
- LAZZARI, F. A. *Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações*. 2. ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997.
- NOGUEIRA NETTO, V. S. *Impactos do Mercosul na produção e comercialização do milho e da soja na região Centro-Oeste*. 1996. 90 f. Dissertação (Mestrado em Economia Rural)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.
- PRADO, G. Micotoxinas em alimentos. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 14., 2005, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Fundação Ezequiel Dias, 2005. 52 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B; SABINO, M. Pesquisa em micotoxinas no Brasil: a última década em foco. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2002.

SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Mycotoxin research in Brazil. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 359-371, 1993.

SOUZA, P. M. de; BRAGA, M. J. Aspectos econômicos da produção e comercialização do milho no Brasil. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). *Tecnologia de produção do milho*. Viçosa: Ed. da UFV, 2004. p. 13-54.

TRUCKSESS, M. W. et al. Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts, and peanut butter: collaborative study. *Journal AOAC*, Arlington, v. 74, n. 1, p. 81-88, 1991.

VARGAS, E. A.; SOUZA, L. M. Programa nacional de controle de micotoxinas em produtos, subprodutos e derivados de origem vegetal - PNCMV. In: SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1., 1999, São Paulo. *Trabalhos apresentados...* São Paulo: Fundação Cargill, 1999, p. 193-199.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.D. *SANEST: Sistema de análise estatística para microcomputadores*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1984.